

Aus dem Hygiene-Institut der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Professor Dr. H. Kliewe)

**Zum Problem der Stickstoffbilanz beim Keimwachstum
in Stabilisatoren**

INAUGURAL — DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von
DIETLINDE STEFFENS
aus Naumburg/Saale

Mainz 1962

2

Dekan: Prof. Dr. H. Bredt
Referent: Prof. Dr. E. v. Wasielewski
Korreferent: Prof. Dr. H. Kiewe

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Zum Problem der Stickstoffbilanz beim Keimwachstum in Stabilisatoren

Von D. Steffens



In den letzten Jahren wurden in steigender Zahl Berichte über bakteriell bedingte, z. T. tödlich verlaufende Zwischenfälle bei Bluttransfusionen veröffentlicht (Lit. bei *Matthes*¹). Katamnestiche Untersuchungen an Vergleichschargen ergaben, daß in vielen Fällen die Verkeimung der Konserve bereits vor Einfüllen des Spenderblutes bestanden hatte; infolge unzureichender Sterilisation persistierten Bakterien entweder in sog. kalten Luftinseln der Flasche² oder in der Stabilisatorflüssigkeit selbst³⁻⁶. Es handelte sich dabei meist um gramnegative Stäbchen aus der Gruppe der Entero- und Pseudomonasbakterien²⁻⁶, sehr viel seltener um grampositive Stäbchen oder Kokken^{7,8}.

Da die Stabilisatorflüssigkeit nur aus Dextrose, dem System Acid. citr./Natr.citr. und Aqua bidest. besteht, stellt sie – wenn überhaupt – einen ausgesprochenen Mangelnährboden für Bakterien dar³. Die in ihr gedeihenden Keime müssen folgende Eigenschaften besitzen: Säuretoleranz (pH des Stabilisators um 5,0), Wachstum unter verminderter O₂-Spannung (Unterdruck in der Konserve) und das Vermögen, atmosphärischen Stickstoff zu binden, da eine Stickstoffquelle – jedenfalls streng genommen – im Stabilisator nicht vorhanden ist. Als Kohlenstoffquelle dienen Dextrose und/oder Citrat.

Wir haben zur Klärung der Frage einer Luftstickstoffverwertung durch die genannten Keime einige vergleichende Untersuchungen über Stickstoffgehalt, Bakterienwachstum und Stickstoffendwerte in Stabilisatoren durchgeführt.

Methodik

Zur Untersuchung gelangten die Stabilisatoren der Firmen *Biotest*, *Braun-Melsungen* und *Fresenius*.

Die Bakterienstämme wurden aus Untersuchungsmaterial gezüchtet; es handelte sich um: 15 Stämme von *E. coli*, je 3 Stämme von *Aerobacter aerogenes* und *Pseudomonas aeruginosa*, je 1 Stamm von *Pseudomonas fluorescens*, *Candida albicans*, *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*, Streptokokken der Viridansgruppe und *B. mesentericus*.

Zur Herstellung der Inokula wurden 5 ml einer 18 stdg., bei 37° C bebrüteten Traubenzuckerbouillonkultur zentrifugiert, der Bodensatz dreimal in steriler physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und dann in 8 ml steriler physiologischer NaCl-Lösung resuspendiert. Bei der Beimpfung verwendeten wir 0,4 ml dieser Suspension pro 14,6 ml Stabilisatorflüssigkeit. In einigen Fällen wurde diese vorher mit n/1 NaOH neutralisiert.

Von einer bestimmten Menge (180 resp. 120 oder 90 ml) des jeweiligen Stabilisators, dessen Keimfreiheit und N-Gehalt vorher festgestellt worden war, wurde zunächst eine 15 ml-Probe abgetrennt, bis zum Versuchsabschluß bei Zimmertemperatur aufbewahrt und

dann erneut auf Sterilität und N-Gehalt geprüft (Leerkontrolle). Die verbliebene Flüssigkeitsmenge wurde nach dem oben angegebenen Schema beimpft. Nach gründlicher Durchmischung bestimmten wir unmittelbar im Anschluß an die Beimpfung die Keimzahl pro ml (0,1 ml Entnahme und Verdünnung) und den N-Gehalt von 15 ml Flüssigkeit. Sodann teilten wir den Restansatz in Einzelportionen zu je 15 ml auf und bebrüteten diese bei verschiedenen Temperaturen 5 Tage lang. Nach Ablauf der Versuchszeit wurden erneut Keimzahl pro ml und der N-Gehalt der einzelnen Portionen ermittelt.

In einer Parallelversuchsserie kamen analoge Ansätze unter weitgehend anaeroben Bedingungen zur Bebrütung. Eine Inkubation im völlig luftfreien Kulturgefäß war aus technischen Gründen nicht zu erreichen. Im Unterschied zu den aeroben Ansätzen wurde die Stabilisatorflüssigkeit zunächst in 15 ml-Spezialampullen (mit minimalem überstehendem Luftraum) abgefüllt, zum Zwecke der Entgasung kurz auf 70° erhitzt, nach Abkühlung beimpft und die Keimzahl jeder Probe bestimmt. Die bei diesen Manipulationen erneut eingebrachte Luftmenge wurde durch Absaugen (mittels Wasserstrahlpumpe) entfernt, die Gefäße verschlossen und bebrütet.

Sämtliche Ansätze wurden doppelt ausgeführt.

Die Stickstoffbestimmungen wurden in einer Mikrokjeldahlapparatur vorgenommen. – Bei der Veraschung haben wir nach einem Vorschlag von *Brahm-Vogelsanger*⁹ jedem 15 ml-Ansatz 15–20 ml Perhydrol zugefügt, wodurch die Veraschungszeit erheblich verkürzt wurde. Die Rückstände der einzelnen Proben wurden mit Aqua dest. auf 25 ml aufgefüllt. Zur N-Analyse entnahmen wir pro Probe dreimal je 5 ml (entsprechend 3 ml Stabilisator). Die arithmetischen Mittel dieser auf 1 ml umgerechneten Werte finden sich in Tab. 1.

Die Leerwertbestimmungen wurden zusätzlich noch an 100 ml-Proben durchgeführt.

Ergebnisse

Die Ergebnisse sind aus Tabelle 1 ersichtlich. Wir konnten feststellen, daß je ein Stamm von *Aerobacter aerogenes* und *Pseudomonas fluorescens* in der Lage war, sich im Stabilisator zu vermehren; *Pseudomonas fluorescens* jedoch nur nach Neutralisation der Flüssigkeit (pH um 7.0) und bei einer Bebrütungstemperatur von 20° C. Bei den übrigen getesteten Keimen (*E. coli*, 2 weiteren Stämmen von *Aerobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* und allen grampositiven Erregern) konnte ein Wachstum – unter Berücksichtigung der Fehlerbreite der Apparatur – nicht beobachtet werden. Die Stickstoffbilanz derjenigen Ansätze, die vermehrungsfähige Keime enthielten, erwies sich als positiv, d. h. der N-Endwert war größer als der N-Ausgangswert. Außerdem ließ sich vermuten, daß sämtliche untersuchten Stabilisatoren in Spuren Stickstoff enthielten.

Diskussion

Das Wachstum von Bakterien in Stabilisatorflüssigkeit wurde systematisch von *Schmidt* u. *Brand*³ untersucht. Die Autoren fanden eine ausgesprochene Keimvermehrung nur bei *Aerobacter aerogenes*, *S. enteritidis* und *S. typhi murium*. In der Flüssigkeit vermochten sich ferner folgende Keime, allerdings ohne nachweisliche Vermehrung, am Leben zu erhalten: *E. coli* »mucosum«, *Ps. aeruginosa*, *S. paratyphi B*, und *B. cereus*. Die Bebrütung erfolgte in diesen Versuchen über 5 Tage bei 37° C und anschließend über 35 Tage bei 18° C unter aeroben Bedingungen; Stickstoffbilanzen wurden nicht ermittelt.

Stabilisator (Bebrütungs- art)	N-Gehalt γ/ml	Bebrü- tungstem- peratur Grad C	Bakterienart							
			Pseudomonas fluor. (pH=7.0)				Aerobacter aerog. (pH=5.0)			
			Ausgangs- wert/ml		Endwert/ml		Ausgangs- wert/ml		Endwert/ml	
			γN	Keim- zahl	γN	Keim- zahl	γN	Keim- zahl	γN	Keim- zahl
Braun- Melsungen (aerob)	0.6	4	} 4.2	} 10 ⁷	7.5	0	} 3.7	} 10 ⁷	7.0	0
		20			9.4	0			10.7	0
		37			*)	0			*)	0
Biotest (aerob)	0.6	4	} 1.9	} 10 ⁷	9.4	10 ⁸	} 3.9	} 10 ⁷	8.0	10 ⁸
		20			11.6	10 ⁹			14.0	10 ⁹
		37			*)	0			*)	10 ⁹
Fresenius (aerob)	0.9	4	} 5.6	} 10 ⁷	7.0	10 ⁸	} 5.6	} 10 ⁷	6.5	10 ⁸
		20			18.6	10 ⁹			21.0	10 ⁹
		37			*)	0			*)	10 ⁹
Fresenius (anaerob)	1.9	4	} 2.3	} *)	*)	*)	} 1.9	} *)	*)	*)
		20			5.0	*)			6.0	*)
		37			7.5	*)			3.7	*)

*) = nicht geprüft.

Tab. 1: N-Gehalt und Keimzahl in beimpften Stabilisatoren vor und nach der Bebrütung

Der Nachweis eines Wachstums bei den genannten Salmonellen³ sowie – in unseren Versuchen – von *Pseudomonas fluorescens* ist um so erstaunlicher, als bei diesen Bakterien das Vermögen einer Fixierung atmosphärischen Stickstoffs bisher nicht beobachtet wurde. Zwar bleibt zur Erklärung der Versuchsergebnisse von *Schmidt* und *Brand*³ die Möglichkeit bestehen, daß Spuren des im Stabilisator vorhandenen organisch oder anorganisch gebundenen Stickstoffs ausreicht haben, um die Keime zur Vermehrung zu bringen; jedoch haben wir in unseren Versuchsreihen parallel zum Wachstum auch eine Zunahme des Stickstoffgehaltes in den mit *Aerobacter aerogenes* bzw. *Ps. fluorescens* beimpften Stabilisatorproben beobachtet. Ein initiales Wachstum fände in dem geringen N-Gehalt der Stabilisatorflüssigkeit seine Erklärung; die Zunahme an Stickstoff im Medium wird aber hierdurch nicht verständlich. Dieser Stickstoff kann nur aus einer Quelle stammen, die nicht primär im System vorhanden war, was für den Luftstickstoff, der sich über dem Medium oder in ihm physikalisch gelöst befindet, zuträfe.

Von den in der Humanpathologie bedeutsamen Bakterien sind bisher nur wenige bekannt, die atmosphärischen Stickstoff zu binden vermögen, nämlich bestimmte Stämme der *Pseudomonas*^{10,11}, *Achromobacter*¹²⁻¹⁴ – und *Aerogenes*¹⁵⁻¹⁷ – Gruppe (zusammenfassende Darstellung der biochemischen Grundlagen bei *Wilson* und *Burris*¹⁸ sowie bei *Nason* und *Takahashi*¹⁹). Es erhob sich somit die Frage, inwieweit bei unseren Versuchen methodische Fehler im Spiele waren, die die Verwertbarkeit der Ergebnisse beeinträchtigen könnten. Als solche kämen in Frage:

1. eine etwaige Abgabe von Stickstoff aus dem Bebrütungsgefäß an die Flüssigkeit,
2. die Fehlerbreite der Kjeldahl-Apparatur,
3. eine Verunreinigung der über bzw. in der bebrüteten Flüssigkeit befindlichen Luft mit N-haltigen organischen Substanzen.

Ad 1: Dieser Fehler wurde durch die Leerkontrolle sowie durch die Tatsache, daß in den gleichen Gefäßen nach Beimpfung mit grampositiven Keimen ausgeglichene N-Bilanzen registriert werden konnten, ausgeschlossen.

Ad 2: Nach *Wilson*²⁰ kann die N-Bindung in stickstoffarmen Medien (unter 10 γ /ml) so gering sein, daß sie in die Fehlerbreite der Apparatur fällt. Ebenfalls können Zuwachsraten bis 10 γ N/ml nicht als schlüssiger Beweis einer N-Fixierung gewertet werden. – In der Stabilisatorflüssigkeit liegt tatsächlich ein N-armes, wenn nicht überhaupt N-freies Medium vor. Die Zuwachsraten, die wir bei anaerober Bebrütung feststellten, müssen demnach mit großer Vorsicht bewertet werden; es bleibt jedoch die Tatsache bestehen, daß bei aerober Bebrütung in den angeführten Fällen N-Endwerte ermittelt werden konnten, die einem jenseits der Fehlergrenze liegenden Zuwachs entsprechen müssen. Parallel hierzu ließ sich auch in den Plattenkontrollen ein deutliches Bakterienwachstum nachweisen.

Bei dem im Stabilisator herrschenden pH war freilich keine stark ausgeprägte N-Fixierung zu erwarten. Für *Aerobacter aerogenes* wurde von *Jensen*¹⁶ nachgewiesen, daß ein saures Milieu auf den genannten Vorgang im Sinne der Hemmung einwirkt, was wir auch für den von uns verwendeten *Pseudomonas*-Stamm bestätigen konnten.

Ad 3: Diese Möglichkeit konnten wir nicht vollständig ausschließen, da die Bebrütungsgefäße unter Umständen selbst nach Evakuierung noch geringe Mengen Luft, die ihrerseits verunreinigt sein konnte, enthielten. Der Mechanismus einer N-Fixierung aus verunreinigter Luft ist jedoch beim staubdicht abgeschlossenen Gefäß zumindest unwahrscheinlich und dürfte auch kaum für den von uns beobachteten relativ großen Stickstoffzuwachs verantwortlich sein. Darüber hinaus hätte sich eine solche Fehlerquelle nicht lediglich bei den Kulturen mit positiven N-Bilanzen, sondern gleichermaßen bei allen Keimen ergeben müssen.

Ob der O_2 -Partialdruck für die Stickstoff-Fixierung von entscheidender Bedeutung ist, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden (einander widersprechende Angaben von *Pengra* u. *Wilson*¹⁷ und *Jensen*¹⁶).

Obwohl wir aus technischen Gründen den Einbau von N^{15} , dessen Nachweis das einzig sichere Kriterium für die Fixierung atmosphärischen Stickstoffs darstellt²⁰, nicht demonstrieren konnten, glauben wir doch auf Grund unserer Versuche, daß die aufgeführten Befunde für eine Verwendung von Luftstickstoff durch die genannten Keime sprechen. Damit fänden auch die früher mitgeteilten Befunde einer Verunreinigung der Stabilisatorflüssigkeit durch Bakterien der *Aerobacter*- und *Pseudomonas*gruppe ihre Erklärung. In den Fällen mit Nachweis von Keimen, die in der Flüssigkeit nicht zu wachsen

vermögen, wird man annehmen müssen, daß die Inhaltsstoffe des Stabilisators, vor allem die Dextrose, Stickstoffmengen enthielten, die für ein Wachstum der betreffenden Keime ausreichten.

Zusammenfassung

Es wurde das Keimwachstum in Verbindung mit Stickstoffbilanzen in experimentell infizierten Blutkonserve-Stabilisatoren untersucht. Hierbei zeigte sich, daß bei einzelnen Stämmen gramnegativer Stäbchen eine deutliche Keimvermehrung in diesen Medien stattfindet, obwohl sie in ihrer chemischen Zusammensetzung keine Stickstoffquelle enthalten. Da es im Verlauf der Keimvermehrung zu einer progressiven N-Zunahme kam (Initialwert der beimpften Stabilisatormenge 4–6 γ , Endwert zwischen 10 und 20 γ /ml), vermuten wir, daß eine Fixierung atmosphärischen Stickstoffs durch die genannten Keime stattgefunden hat. Kontrollteste mit anderen gramnegativen sowie mit grampositiven Bakterien verliefen negativ.

Literatur: 1 Matthes M.: Dtsch. med. Wschr. 84, 483 (1959). — 2 Mc Entegart, M. G.: Lancet 1956, 909. — 3 Schmidt, B., G. Brand: Blut 3, 301 (1957). — 4 Pettenkofer, J.: Zbl. Bakt. I. Orig. 170, 223 (1957). — 5 Stevens A. R., J. S. Legg, B. S. Henry, J. M. Dille, W. M. M. Kirby, C. A. Finch: Ann. intern. Med. 39, 1228 (1953). — 6 Spielmann, W., J. Schütz: Dtsch. med. Wschr. 82, 2157 (1957). — 7 Heilmeyer, L., P. Marquardt, E. Carl, M. Matthes: Dtsch. med. Wschr. 78, 931 (1953). — 8 Bang, H. O., P. Paaby: Nord. Med. 58, 1268 (1957). — 9 Brahm-Vogelsanger A.: Mündl. Mitteilg. — 10 Voets, J. P., J. Debacker: Naturwiss. 43, 40 (1956). — 11 Anderson, G. R.: J. Bact. 70, 129 (1955). — 12 Proctor, M. H., P. W. Wilson: Nature, London 182, 891 (1958). — 13 Jensen, V.: Arch. Mikrobiol. 29, 348 (1958). — 14 Proctor, M. H., P. W. Wilson: Arch. Mikrobiol. 32, 254 (1959). — 15 Hamilton, P. B., W. B. Magee, L. E. Mortensen: Bact. Proc. 1953, 82. — 16 Jensen, V.: Physiol. Plant. 9, 130 (1956). — 17 Pengra, R. M., P. W. Wilson: J. Bact. 75, 21 (1958). — 18 Wilson, P. W., R. H. Burris: Annu. Rev. Microbiol. 7, 415 (1953). — 19 Nason, A., H. Takahashi: Annu. Rev. Microbiol. 12, 203 (1958). — 20 Wilson P. W.: Advanc. Enzymol. 13, 345 (1952). —

Lebenslauf

Am 29. 11. 1936 wurde ich in Naumburg a. d. Saale als Tochter des Lehrers Otto *Steffens* und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. *Rössner*, geboren. Ich habe eine um drei Jahre jüngere Schwester.

Nach den Grundschulen in Naumburg und Diesdorf besuchte ich von 1951-1955 die Oberschule in Beetzendorf, Kreis Salzwedel, an der ich im Jahre 1955 die Reifeprüfung ablegte. Von 1955-1957 studierte ich an der Humboldt-Universität Berlin, Zahnmedizin. 1957 immatrikulierte ich mich an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz für Humanmedizin. Dort legte ich auch mein Physikum ab. Seit Herbst 1959 studiere ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, wo ich im Jahre 1962 mein medizinisches Staatsexamen ablegen werde.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

